

(1→3)- β -D-葡聚糖检测对深部真菌感染早期诊断的意义

魏雁虹 杨广民 谢风

作者单位:130021 长春市,吉林省人民医院检验科(魏雁虹 杨广民)

130033 长春市,吉林大学中日联谊医院检验科(谢风)

通讯作者:谢风, E-mail: xiefeng11@126.com

【摘要】 目的 探讨(1→3)- β -D-葡聚糖检测对深部真菌感染早期诊断的意义。**方法** 收集吉林大学中日联谊医院住院患者送检标本 73 份(血清、尿液、关节腔穿刺液、胸腹水、肺泡灌洗液等),同时收集 40 份健康成人血清作为正常对照。应用 SLP 真菌检测试剂盒定性及定量检测不同临床标本中(1→3)- β -D-葡聚糖含量。**结果** 73 份标本中检出真菌阳性标本 47 份,阳性率 64.4%。利用 SLP 肉眼观察法,可观察到深部真菌感染组有明显黑色素形成,而正常对照组则无明显黑色素形成;定量检测结果显示,深部真菌感染组标本中(1→3)- β -D-葡聚糖含量较对照组明显增加,且差异有统计学意义($P < 0.05$)。**结论** 利用 SLP 试剂盒检测(1→3)- β -D-葡聚糖较传统真菌培养法简便、快速、灵敏度高,可用于深部真菌感染的早期快速诊断。

【关键词】 (1→3)- β -D-葡聚糖; SLP; 深部真菌感染; 早期诊断

The meaning of (1→3)- β -D-glucan-detection in the early diagnosis of deep fungal infection

WEI Yan-hong¹, YANG Guang-min¹, XIE Feng². ¹Department of Clinical Laboratory, Jilin Province People's Hospital, Changchun, 130021, China ²Department of Clinical Laboratory, Jilin University China-Japan Friendship Hospital, Changchun, 130033, China

【Abstract】 Objective To explore the meaning of (1→3)- β -D-glucan detection for the diagnosis of deep fungal infection. **Methods** 73 samples from hospitalized patients in China-Japan Friendship Hospital and 40 cases of serum samples of healthy adult(control group) were collected. The concentration of (1→3)- β -D-glucan in different clinical specimens (including serum, urine, joint punctate, hydrothorax and hydroperitoneum, bronchoalveolar lavage fluid and so on) were detected by SLP fungal test kit for qualitative and quantitative detection. **Results** There were 47 cases fungal positive samples were checkout. Melanin formation was observed significantly in the fungal infection group but not obviously in the control group by using the naked eye observation of SLP. The quantitative detection results showed that the levels of (1→3)- β -D-glucan of each kinds samples in deep fungal infection group was higher than in serum of control group, and the difference had statistical significance ($P < 0.05$). **Conclusion** With more convenient, faster and higher sensitive than fungal cultivation, the detection of (1→3)- β -D-glucan by SLP can be used in the early diagnosis of deep fungal infection.

【Key words】 (1→3)- β -D-glucan; SLP; Deep fungal infection; Early diagnosis

深部真菌感染是指致病性真菌向组织内侵入、增殖所致的皮下组织真菌感染性疾病,具有发病率高、病情进展快、病死率高、治疗费用高、临床及实验室诊断率低等特点。传统的培养方法耗时长、敏感性低、容易受到干扰,难以达到早期诊断、早期治疗、降低病死率的目的。近年来出现了一些快速诊断技术如高分辨 CT、检测真菌抗原和核酸等非培养诊断技术等。其中,对真菌细胞壁成分(1→3)- β -D-葡聚糖的检测已成为目前倍受关注的侵袭性真菌感染诊断

方法^[1]。本文应用 SLP 试剂盒检测不同临床标本中(1→3)- β -D-葡聚糖水平,并与传统真菌培养法加对比,探讨(1→3)- β -D-葡聚糖检测对深部真菌感染的诊断价值,为早期快速、准确、高效诊断深部真菌感染提供新的思路和方法。

1 材料与方法

1.1 标本来源 收集吉林大学中日联谊医院住院患者送检标本 73 份,其中血清 20 份,尿液 18 份,关节腔穿刺液 7 份,胸腹水 12 份,肺泡灌洗液 7 份,脓

液 5 份,皮下积液 4 份;选择无肝肾和呼吸道疾病,近期内未使用过任何抗菌素的健康成人血清 40 份做对照组。其中 10 份用于肉眼观察实验,30 份用于(1→3)- β -D-葡聚糖定量检测实验。

1.2 仪器与试剂 沙保弱培养基购自英国 OXIOD 公司,全自动多功能酶标仪 Wellscan MK-2、台式离心机 TGL-16B,SLP Reagent Set(297-51501)及(1→3)- β -D-葡聚糖标准品均购自日本 Wako 和光纯药。 H_2O_2 及无菌蒸馏水自备。

1.3 真菌培养 将受检标本以离心半径 10 cm,4000 r/min 离心 5 min,用无菌棉签将沉淀物接种于沙保弱培养基上,置 37℃、5% CO_2 孵箱中培养 48 h 至 1 w,观察真菌生长情况;待真菌菌落形成后,将可疑菌落涂片,革兰氏染色镜检。所有标本重复培养两次并记录结果,培养结束后将剩余标本以无菌方法留取,-70℃保存备用。

1.4 (1→3)- β -D-葡聚糖检测

1.4.1 试剂盒准备 ①加 3 ml 稀释液于冻干底物中,轻轻搅匀至底物完全溶解,避免与瓶口接触;②所有溶液加入冻干的 SLP 小瓶中,轻轻搅匀至 SLP 完全溶解,避免与瓶口接触。此溶液即为 SLP 检测液;③实验器械通过 250℃干热灭菌 2 h,并避免被 SLP 反应物污染。

1.4.2 肉眼观察 ①对倍稀释参考物—(1→3)- β -D-葡聚糖,标准品的浓度依次为 1、0.5、0.25、0.125、0.0625、0.0313、0.0156 ng/mL,每孔加入 0.05 ml 的稀释液和样品;②每孔加入 0.05 ml SLP 检测液;③轻轻搅拌后,酶标板于 30℃放置 30 min;④肉眼判断混合液中黑色素的生成,显色的样品为阳性,其他的为阴性。

1.4.3 定量检测 ①待测样品和参考物的稀释系列各 0.05 ml 分别加入酶标板孔中;②用消毒过的加液器快速加入 SLP 检测液,每孔 0.05 ml;③酶标仪上测量标准品及待测孔的吸光度(Kinetic 光波下 650 nm,反应时间 90 min,温度设置 30℃);④制作标准回归 Log 曲线,横轴为吸光度(OD 值),纵轴为 SLP 参考物的浓度;⑤通过标准曲线计算待测样本中(1→3)- β -D-葡聚糖浓度。

1.5 统计学处理 采用 SPSS 13.0 软件进行统计学处理,计量数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间计量资料比较采用 t 检验,以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 培养及镜检结果 73 份患者标本中经过培养共检出真菌阳性标本 47 份,阳性率 64.4%。健康成

人血清真菌培养均为阴性。具体培养结果见表 1。

表 1 真菌培养阳性率结果

标本来源	标本(份)	阳性标本(份)	阳性率(%)
血清	20	14	70.0
尿液	18	13	72.2
关节腔穿刺液	7	3	42.9
胸腹水	12	8	66.7
肺泡灌洗液	7	4	57.1
脓液	5	3	60.0
皮下积液	4	2	50.0
总计	73	47	64.4

2.2 肉眼观察结果 如图 1 所示,反应 30 min 后,不同浓度梯度的(1→3)- β -D-葡聚糖阳性参考物及 47 份经培养证实含有深部真菌感染的临床标本中,可以观察到黑色素的形成,健康成人血清对照组则无明显黑色素形成。

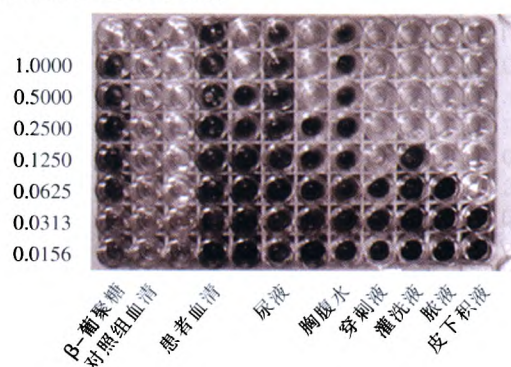


图 1 肉眼检测黑色素形成

2.3 定量检测结果 30 例对照组及 47 份深部真菌感染组中(1→3)- β -D-葡聚糖检测结果见表 2。深部真菌感染组的(1→3)- β -D-葡聚糖水平明显高于对照组,差异有统计学意义($P < 0.05$)。

表 2 (1→3)- β -D-葡聚糖含量检测结果($\bar{x} \pm s$, ng/mL)

标本来源	例数	葡聚糖含量	t 值	P 值
对照组	30	0.013 $\pm$ 0.006	-	-
深部真菌感染组	47	0.769 $\pm$ 0.274	18.925	< 0.01

3 讨论

近年来,随着医学的发展,广谱抗生素、皮质类固醇激素、免疫抑制剂及各种器官移植和插管技术的广泛应用,使真菌感染的发病率明显增加。深部真菌感染越来越严重地威胁着危重患者的健康与生命,其临床表现缺乏特异性。真菌培养阳性率不高,需要有经验的技术人员操作和鉴定,且培养周期较长,不适宜做早期诊断。而且在大多数医院,甚至是三级医院都没有专门的真菌检测部门和人员,根本不开展或无力开展真菌培养工作。这些均提出了一

个迫切课题,即采用新的技术手段提高真菌感染诊断的快速性、特异性和准确性。

目前,检测真菌成分及其代谢产物成为实验室诊断真菌感染的研究热点。(1→3)-β-D-葡聚糖是几乎所有真菌均具有的一种特异性细胞壁成分,当真菌进入人体血液或深部组织后,经吞噬细胞吞噬、消化等处理后,(1→3)-β-D-葡聚糖可从胞壁中释放出来,从而使血液及其它体液(如尿液、脑脊液、腹水、胸水等)中(1→3)-β-D-葡聚糖含量增高。当真菌在体内含量减少时,机体免疫可迅速清除(1→3)-β-D-葡聚糖。而在浅部真菌感染中,(1→3)-β-D-葡聚糖未被释放出来,故其在体液中的量不增高^[2]。因此(1→3)-β-D-葡聚糖检测可以成为诊断侵袭性真菌感染一个十分有意义的指标。Odabasi 等^[3]在一项评价血浆 β-D-葡聚糖在侵袭性真菌感染诊断价值的研究中,得出的结果为敏感性 95%、特异性 91%、阳性预测值 90%、阴性预测值 96%。有研究^[4,5]报道将(1→3)-β-D-葡聚糖用于念珠菌血症的早期诊断明显优于传统的培养法和其它血清学诊断试验。(1→3)-β-D-葡聚糖检测作为深部真菌感染的诊断手段,具有早期、快速及适用范围广的优势,目前已有学者将其用于深部念珠菌和曲霉菌感染的诊断、高危人群的监测以及疗效、预后的评价^[6]。部分学者利用我国自主研发的 MB-80 微生物动态快速检测系统及其配套动态真菌检测试剂盒来进行(1→3)-β-D-葡聚糖含量的定量测定,也取得了满意的结果^[7,8]。

SLP 是日本和光纯药业依据家蚕的自我防护机制生产的特异性测定 (1→3)-β-D-葡聚糖的试剂盒。与其它(1→3)-β-D-葡聚糖检测方法不同的是,SLP 试剂盒的肉眼观察法不需任何特殊器械即可通过肉眼观察黑色素的形成情况来判断标本中是否含有真菌的感染,较传统的真菌培养方法简便、快速,灵敏且易于观察。本文研究中,47 例经培养证实含有深部真菌感染的临床标本中,均可观察到明显黑色素的形成,而正常对照组均为阴性,说明此方法准确灵敏、特异性高。通过使用酶标仪对(1→3)-β-D-葡聚糖进行定量测定可以使检测结果更加精确和敏

感。定量检测结果显示,(1→3)-β-D-葡聚糖含量深部真菌感染组明显高于对照组,差异有统计学意义($P < 0.05$),表明(1→3)-β-D-葡聚糖水平可以作为诊断深部真菌感染的特异性指标。检测(1→3)-β-D-葡聚糖只能提示有无真菌侵袭性感染,但是却不能判断为何种真菌,这是此方法的缺陷,但也可能转化为一种优势。因为近年来,一些罕见的条件致病真菌也可引起深部感染,这就要求一种能迅速确定有无深部真菌感染的方法,因系统抗真菌药物种类较少,抗菌谱较广,不因真菌种类而异。因此当检测到标本中(1→3)-β-D-葡聚糖含量较高时,即刻予以系统抗真菌治疗,不必等到鉴定出种属,否则会贻误最佳治疗时机。SLP 试剂盒以其简便、快速、敏感、特异的特点,有望作为传统检测方法的一个重要补充,为临床提供新的快速早期诊断手段,以发现更多的机会性真菌感染,及早采取治疗措施,从而救治更多的深部真菌感染患者。

4 参考文献

- 1 Yoshida M, Roth RI, Grunfeld C, et al. Soluble (1→3)-beta-D-glucan purified from *Candida albicans*: biologic effects and distribution in blood and organs in rabbits. *J Lab Clin Med*, 1996, 128: 103-114.
- 2 Hope WW, Walsh TJ, Denning DW. Laboratory diagnosis of invasive aspergillosis. *Lancet Infect Dis*, 2005, 5: 609-622.
- 3 Odabasi Z, Mattiuzzi G, Estey E, et al. β-D-Glucan as a diagnostic adjunct for invasive fungal infections: validation, cutoff development, and performance in patients with acute myelogenous leukemia and myelodysplastic syndrome. *Clin Infect Dis*, 2004, 39: 199-205.
- 4 李世荣,王红,文艳. 血浆(1→3)-β-D-葡聚糖与抗深部白色念珠菌感染药物疗效关系的实验研究. *临床和实验医学杂志*, 2007, 6: 20-22.
- 5 赵勇,王红,任爱民,等. 血浆 β-1,3-D-葡聚糖对深部真菌感染诊断的研究. *中国真菌学杂志*, 2007, 2: 202-206.
- 6 李军,席丽艳. 真菌抗原成分及代谢产物在系统性真菌感染诊断方面的应用进展. *国外医学皮肤性病学分册*, 2004, 30: 253-255.
- 7 廖经忠,刘文恩,易斌,等. 血清(1→3)-β-D-葡聚糖检测对深部真菌感染的诊断价值. *实用预防医学*, 2009, 16: 226-228.
- 8 张丽娜. 血浆(1→3)-β-D-葡聚糖检测的临床意义. *现代医药卫生*, 2010, 26: 1555-1556.

(收稿日期:2011-07-12)

(本文编辑:杨军)